

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 409号	学位授与年月日	平成17年12月16日
氏 名	伊 藤 泰 介		
論文題目	Collapse and restoration of MHC class I-dependent immune privilege: Exploiting the human follicle as a model (MHC class I に依存した免疫学的特殊環境の破綻と再生：ヒト毛包 モデルの開発)		

博士(医学) 伊藤 泰介

論文題目

Collapse and restoration of MHC class I-dependent immune privilege: Exploiting the human hair follicle as a model

(MHC class I に依存した免疫学的特殊環境の破綻と再生：ヒト毛包モデルの開発)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

Immune privilege (IP)といわれる免疫寛容を呈する組織は、脳、角膜、前眼房、精巣、胎盤にその存在が報告され、IPの破綻によって各臓器において自己免疫反応による疾患が発症すると考えられている。Pausらは、ヒト成長期毛の近位外毛根鞘(毛乳頭側)、毛母細胞もIP環境の組織であり、円形脱毛症の主な病因の一つがIP環境の破綻であると提唱している。毛包のIPはMHC class Iの低発現、その他transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)、インターロイキン(IL)-10など免疫抑制作用を持つ因子の強発現、抗原提示細胞の機能不全、免疫細胞の浸潤が少ないことなどで特徴づけられる。一方、円形脱毛症病変部の毛包では外毛根鞘や毛母細胞にMHC class Iが強発現し、その周囲にはCD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞が多数浸潤している。特にMHC class Iの強発現が自己反応性CD8陽性T細胞の攻撃を容易にしていると考えられる。

そこで我々はヒト頭皮毛包の器官培養系を用いて、円形脱毛症におけるIP破綻モデルを作成し、次にその破綻状態からの回復を試みることで、将来の円形脱毛症の新たな治療戦略を提案することを考えた。インターフェロン- γ (IFN- γ)を培養液中に添加することでIPの破綻した円形脱毛症に類似した退行期直前の毛包を組織培養系において誘導し、その後様々な因子によって再びIP環境を取り戻せるかという実験系を考えた。

〔材料ならびに方法〕

ヒト毛包：美容形成外科手術において患者の同意のもとに提供された前～側頭部の頭皮からPausらの報告を参考に毛包を摘出した。

毛包の器官培養：標準的な毛包の培養法であるPhilpott法を用いた。摘出した毛包から後期成長期毛を選択してWilliam's E培養液中に4日間培養後、クリオゲル内に包埋し、組織切片作成まで-80℃で保存した。

培養群として、PBS添加群(コントロール)と75IU/ml IFN- γ 添加群に分け2日間培養した。75IU/ml IFN- γ では退行期直前の成長期後期を誘導するが、これ以上のIFN- γ では退行期に移行してしまう。75IU/ml IFN- γ 添加群には、3日目～4日目にPBS、25、50、75、100ng/ml insulin like growth factor(IGF)-1、0.2、0.4 μ g/ml α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH)、100ng/ml IL-10、15、30ng/ml TGF- β 1、 1×10^{-8} M FK506をそれぞれ追加する群を作成した。

免疫組織化学的染色：EnVision法、タイラマイド法(tyramide signal amplification、TSA：タイラマイドを用いた超高感度蛍光染色法)を用いて人のMHC class IであるHLA-A/B/Cの染色強度を観察した。またHLA-A/B/Cの関連蛋白である β 2-ミクログロブリン、transporter associated with antigen processing-2(TAP-2)やIFN- γ の産生を調整する因子であるインターフェロン調整因子[interferon regulatory factor(IRF)-1]、抗原

提示細胞上のMHC class II分子であるHLA-DP/DQ/DR分子の発現強度をTSA法で観察した。

in situ hybridization法：成長期毛の毛乳頭周囲の外毛根鞘や毛母細胞で低下しているHLA-A/B/C蛋白のmRNAの発現をみるためHLA-A、B、C全てに反応するHLAプローブを用いて*in situ* hybridizationを行った。さらにIFN- γ やIGF-1添加によってHLAのmRNA発現の影響を組織上で観察した。

RT-PCR：培養毛においてHLAのmRNA産生が変化するか半定量的RT-PCR法を用いて β -アクチンと比較することで変化を観察した。

〔結果〕

健常人の頭皮の成長期毛の近位外毛根鞘ではHLA-A/B/Cの発現は蛋白レベルのみならずmRNAレベルでも低下していた。培養2日目のHLA-A/B/Cは、PBS添加群は非常に弱く発現したが、75IU/ml IFN- γ を添加した群では近位外毛根鞘、毛母細胞に強発現した。75IU/ml IFN- γ 添加後3日目に25、50、75、100ng/ml IGF-1、0.2、0.4 μ g/ml α -MSH、100ng/ml IL-10、15、30ng/ml TGF- β 1、 1×10^{-8} M FK506を添加した群では、100ng/ml IL-10を除きいずれもHLA-A/B/Cの発現はIFN- γ 未添加群のレベルからそれ以下まで低下した。特にIGF-1は用量依存性に低下した。さらにHLA-A/B/CのmRNA発現は*in situ* hybridizationやRT-PCRにて有意に低下していた。同様に β 2-ミクログロブリン、TAP-2、IRF-1の組織での発現はIFN- γ にて増強し100ng/ml IGF-1にて抑制された。ちなみにIRF-1は健常人頭皮の成長期毛の近位外毛根鞘や毛母細胞では発現していないが、退行期毛では強くみられた。

〔考察〕

円形脱毛症の病変部毛包組織ではHLA-A/B/Cの発現が上昇している。この発現を抑制させCD8陽性T細胞からの自己免疫反応を回避させることで円形脱毛症の予防が期待される。今回、ヒト毛包の器官培養にIFN- γ を添加することで、毛包にHLA-A/B/C、 β 2-ミクログロブリン、TAP-2の発現を上昇させ、円形脱毛症にみられるIPの破綻のモデルを*in situ*で再現した。更にこの培養系に様々な成長因子を加えることによりIPの破綻を回復させることに成功した。毛包のIPを維持するために重要な役割をしているIGF-1、 α -MSHや免疫抑制作用が認められるTGF- β 1、FK506はIFN- γ 誘導性HLA-A/B/C発現の上昇を蛋白レベル、mRNAレベルで抑制した。特にIGF-1は、 β 2-ミクログロブリン、TAP-2、IRF-1の発現も有意に抑制した。

いまだ十分に有効な治療法のない円形脱毛症において、新たな治療の選択肢の一つとして、IGF-1、 α -MSH、TGF- β 1を投与することによって毛包のIPの破綻を回復、もしくは回避し、円形脱毛症の発症を抑制する治療法となることが多いに予想される。

論文審査の結果の要旨

Immune privilege (IP)といわれる免疫寛容を呈する組織は、脳、角膜、前眼房、精巣、胎盤にその存在が報告され、IPの破綻によって各臓器において自己免疫反応による疾患が発症すると考えられている。Pausらは、ヒト成長期毛の近位外毛根鞘(毛乳頭側)、毛母細胞もIP環境の組織であり、円形脱毛症の主な病因の一つがIP環境の破綻であると提唱している。毛包のIPはMHCクラスIの低発現、その他transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)、インターロイキン(IL)-10など免疫抑制作用を持つ因子の強発現、抗原提示細胞の機能不全、免疫細胞の浸潤が少ないことなどで特徴づけられる。一方、円形脱毛症病変部の毛包では外毛根鞘や毛母細胞にMHC class Iが強発現し、その周囲にはCD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞が多数浸

潤している。特にMHC class Iの強発現が自己反応性CD8陽性T細胞の攻撃を容易にしていると考えられる。申請者らはヒト頭皮毛包の器官培養系を用いて、円形脱毛症におけるIP破綻モデルを作成し、次にその破綻状態からの回復を試みることで、将来の円形脱毛症の新たな治療戦略の基盤をめざした。具体的にはインターフェロン- γ (IFN- γ)を培養液中に添加することでIPの破綻した円形脱毛症に類似した退行期直前の毛包を組織培養系において誘導し、その後様々な因子によって再びIP環境を取り戻せるかという実験系を考案した。

〔材料ならびに方法〕

美容形成外科手術において患者の同意のもとに提供された前～側頭部の頭皮からPausらの報告を参考に毛包を摘出した。器官培養は、標準的な毛包の培養法であるPhilpott法を用いた。つまり、摘出した毛包から後期成長期毛を選択してWilliam's E培養液中に4日間培養後、クリオゲル内に包埋し、組織切片作成まで-80℃で保存した。培養群として、PBS添加群(コントロール)と75IU/ml IFN- γ 添加群に分け2日間培養した。75IU/ml IFN- γ では退行期直前の成長期後期を誘導するが、これ以上の量のIFN- γ では退行期に移行してしまう。75IU/ml IFN- γ 添加群には、3日目～4日目にPBS、25、50、75、100ng/ml insulin like growth factor(IGF)-1、0.2、0.4 μ g/ml α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH)、100ng/ml IL-10、15、30ng/ml TGF- β 1、 1×10^{-8} M FK506をそれぞれ追加する群を作成した。

EnVision法、タイラマイド法を用いて人のMHC class IであるHLA-A/B/Cの染色強度を観察した。またHLA-A/B/Cの関連蛋白である β 2-ミクログロブリン、transporter associated with antigen processing-2(TAP-2)やIFN- γ の産生を調整する因子であるインターフェロン調整因子[interferon regulatory factor(IRF)-1]、抗原提示細胞上のMHC class II分子であるHLA-DP/DQ/DR分子の発現強度はタイラマイド法で観察した。

HLA-A/B/C蛋白のmRNAの発現をみるためHLA-A、B、C全てに反応するHLAプローブを用いて*in situ* hybridizationを行った。さらにIFN- γ やIGF-1添加によるこれらの発現の影響を組織上で観察した。培養毛のHLAのmRNA産生が変化する半定量的RT-PCR法を用いて β -アクチンと比較することで変化を観察した。

〔結果〕

健常人の頭皮の成長期毛の近位外毛根鞘ではHLA-A/B/Cの発現は蛋白レベルのみならずmRNAレベルでも低下していた。培養2日目では、75IU/ml IFN- γ を添加した群では近位外毛根鞘、毛母細胞に強発現した。75IU/ml IFN- γ 添加後3日目にIGF-1、0.2、 α -MSH、IL-10、TGF- β 1、FK506を添加すると、IL-10を除きいずれもHLA-A/B/Cの発現がIFN- γ 未添加時のレベル以下まで低下した。特にIGF-1では用量依存性に低下した。HLA-A/B/CのmRNA発現は*in situ* hybridizationやRT-PCRでも有意な低下を確認した。一方 β 2-ミクログロブリン、TAP-2、IRF-1の発現はIFN- γ 添加で増強、IGF-1で抑制された。

〔結論と考察〕

以上の結果から、申請者は円形脱毛症病変部でのHLA-A/B/C発現の上昇による自己免疫反応を回避させる、あらたな治療戦略IGF-1、 α -MSH、TGF- β 1の投与を提案した。

この研究に対し審査委員会では以下の質問を行った。

1) ヒトの毛の自然史について

- 2) 種々の膠原病の機序との共通点
- 3) 毛包移植、その拒絶と定着の機構について
- 4) EnVision、TSA法のときに用いた陰性コントロール
- 5) 自己免疫機序であることの病理学的証拠
- 6) 器官培養の具体的手技
- 7) Immune privilegeである他の臓器にも同様のことがなりたつか
- 8) いわゆる市販の毛はえ薬の成分と作用機序

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梶	村	春	彦	
	副査	宮	本	愛	副査	大 橋 弘 幸